

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-49004

(P2004-49004A)

(43) 公開日 平成16年2月19日 (2004.2.19)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00      Z N A A	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027	A 0 1 K 67/027	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 請求項の数 24 O L (全 48 頁) 最終頁に続く		

審査請求 未請求 請求項の数 24 O L (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-189777 (P2002-189777)	(71) 出願人	396020800
(22) 出願日	平成14年6月28日 (2002.6.28)		科学技術振興事業団
(31) 優先権主張番号	特願2002-158452 (P2002-158452)		埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(32) 優先日	平成14年5月31日 (2002.5.31)	(74) 代理人	100107984
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 廣田 雅紀
		(72) 発明者	芳賀 達也
			神奈川県逗子市沼間2-3-1-411
		(72) 発明者	武田 茂樹
			群馬県桐生市梅田町1-246-1 梅田
			ハイツA-14
		(72) 発明者	山本 篤史
			千葉県松戸市緑台1010 ティアラシテ
			ィ519

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 5-oxo-ETE受容体タンパク質及びその遺伝子

## (57) 【要約】

【課題】生体内情報伝達機構の発見や新規薬物標的蛋白質の同定を可能とすることができ  
る5-oxo-ETE受容体タンパク質やその遺伝子、5-oxo-ETE受容体のアゴ  
ニストやアンタゴニストを提供すること。

【解決手段】ヒトゲノム配列からG蛋白質共役受容体をコードすると思われる遺伝子を多  
数検索し、それらのいくつかをクローニングした。クローニングした遺伝子の3'末端部  
分にG i 1のαサブユニットの遺伝子を結合したものを作製し、これらを昆虫細胞に導入  
し、受容体-G i 1α融合タンパク質を発現させた。この融合タンパク質の受容体部分に  
アゴニストが結合するとG i 1αの部分に[<sup>35</sup>S]-GTPγSが結合することが、受  
容体とGタンパク質の性質から期待できる。そこで作製した融合タンパク質の中に5-  
oxo-ETEの用量依存的に[<sup>35</sup>S]-GTPγSの結合を増加させるものがあるかど  
うか検索した。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の (a) 又は (b) の 5-oxo-ETE 受容体タンパク質をコードする DNA。

(a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質

## 【請求項 2】

配列番号 1 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含む 5-oxo-ETE 受容体タンパク質をコードする DNA。

## 【請求項 3】

請求項 2 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ 5-oxo-ETE 受容体タンパク質をコードする DNA。

## 【請求項 4】

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる 5-oxo-ETE 受容体タンパク質。

## 【請求項 5】

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる 5-oxo-ETE 受容体タンパク質。

## 【請求項 6】

請求項 4 又は 5 記載の 5-oxo-ETE 受容体タンパク質と、マーカータンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質。

## 【請求項 7】

請求項 4 又は 5 記載の 5-oxo-ETE 受容体タンパク質に特異的に結合する抗 5-oxo-ETE 受容体抗体。

## 【請求項 8】

請求項 4 又は 5 記載の 5-oxo-ETE 受容体タンパク質を産生することができる発現系を含む DNA。

## 【請求項 9】

請求項 4 又は 5 記載の 5-oxo-ETE 受容体タンパク質を発現することができる発現系を含む宿主細胞。

## 【請求項 10】

請求項 4 又は 5 記載の 5-oxo-ETE 受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損し又は前記遺伝子が過剰発現する非ヒト動物。

## 【請求項 11】

請求項 4 若しくは 5 記載の 5-oxo-ETE 受容体タンパク質又は該 5-oxo-ETE 受容体タンパク質を発現している細胞膜と、被検物質とを用いることを特徴とする 5-oxo-ETE 受容体の機能促進若しくは抑制物質又は 5-oxo-ETE 受容体の発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

## 【請求項 12】

請求項 4 若しくは 5 記載の 5-oxo-ETE 受容体タンパク質又は 5-oxo-ETE 受容体タンパク質を発現している細胞膜と、5-oxo-ETE と、被検物質とを用いることを特徴とする 5-oxo-ETE 受容体の機能促進若しくは抑制物質又は 5-oxo-ETE 受容体の発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

## 【請求項 13】

請求項 4 若しくは 5 記載の 5-oxo-ETE 受容体タンパク質を発現している細胞と、被検物質とを用いることを特徴とする 5-oxo-ETE 受容体の機能促進若しくは抑制物質又は G 蛋白質共役受容体の発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

## 【請求項 14】

請求項 10 記載の非ヒト動物と、被検物質とを用いることを特徴とする 5-oxo-ETE 受容体の機能促進若しくは抑制物質又は 5-oxo-ETE 受容体の発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 15】

非ヒト動物が、マウスであることを特徴とする請求項 14 記載の 5-oxo-ETE 受容体の機能促進若しくは抑制物質又は 5-oxo-ETE 受容体の発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

## 【請求項 16】

5-oxo-ETE 受容体のアゴニスト。

## 【請求項 17】

5-HETE 又はアラキドン酸である請求項 16 記載のアゴニスト。

## 【請求項 18】

5-oxo-ETE 受容体のアンタゴニスト。

10

## 【請求項 19】

エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、リノレン酸又はそれらの誘導体である請求項 18 記載のアンタゴニスト。

## 【請求項 20】

5-oxo-ETE 受容体の機能促進又は発現増強を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として、請求項 4 若しくは 5 記載の 5-oxo-ETE 受容体タンパク質、請求項 16 若しくは 17 記載のアゴニスト、又は請求項 1～3 のいずれか記載の DNA を含む医薬組成物。

## 【請求項 21】

5-oxo-ETE 受容体の機能又は発現の抑制を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として、請求項 18 若しくは 19 記載のアンタゴニスト、又は請求項 1～3 のいずれか記載の DNA の発現を抑制する DNA 若しくは RNA を含む医薬組成物。

20

## 【請求項 22】

検体中の 5-oxo-ETE 受容体タンパク質をコードする DNA 配列を、請求項 4 若しくは 5 記載の 5-oxo-ETE 受容体タンパク質をコードする DNA 配列と比較することを特徴とする 5-oxo-ETE 受容体の機能又は発現に関連する疾病の診断方法。

## 【請求項 23】

請求項 4 若しくは 5 記載の 5-oxo-ETE 受容体タンパク質をコードする DNA 又は RNA のアンチセンス鎖の全部又は一部からなる 5-oxo-ETE 受容体の機能又は発現に関連する疾病の診断用プローブ。

30

## 【請求項 24】

請求項 23 記載の診断用プローブ及び／又は請求項 7 記載の抗体を含有する 5-oxo-ETE 受容体の機能又は発現に関連する疾病の診断薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、5-oxo-ETE や 5-HPETE に対する受容体（以下、「5-oxo-ETE 受容体」という）タンパク質をコードする DNA や、5-oxo-ETE 受容体タンパク質や、該 5-oxo-ETE 受容体のアゴニスト又はアンタゴニスト等に関する。

40

## 【0002】

## 【従来の技術】

G 蛋白質共役受容体（GPCR：G-protein coupled receptor）は、細胞膜上に存在し、細胞外からのいろいろな情報を受け取る蛋白質である。GPCR は膜を 7 回貫通するという共通構造をもつスーパーファミリーを形成しており、その一つひとつが光、匂い、味といった感覚のセンサーとして働いたり、ホルモン、神経伝達物質、生理活性物質、局所仲介物質等の細胞外リガンドと結合することによって、これら受容体のコンホメーションを変化させて、Gi、Gt、Gs、Go、Gq 等の G 蛋白質（GTP-binding protein）を活性化して、細胞内にシグナルを伝達することが知られている。また、各種生体の細胞内や臓器内の複雑な機能を調節する細胞外リ

50

ガンドは、生体機能を調節する医薬品として活用されており、現在使用されている臨床薬の30～50%はGPCRを標的とするリガンドではないかと考えられている。近年の遺伝子クローニング技術の発達により、そのリガンドが同定されていない“オーファンGPCR”の遺伝子が数多く見つかり、新規GPCRの探索やその機能解明が求められており、かかる新規GPCR遺伝子をクローニングすることは、アゴニストやアンタゴニストなどのGPCRに特異的なリガンドの探索に有用であることが知られている。しかし、GPCRはその全てが明らかとされているわけではなく、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質HEOAD54もGPCRファミリーとして知られている（特開平11-98988号公報）が、そのリガンドが何であるかは知られていなかった。

#### 【0003】

一方、5-oxo-E TE (5-oxo6E, 8Z, 11Z, 14Z-eicosatetraenomic acid)、5-HETE (5(±)-Hydroxyeicoso-6E, 8Z, 11Z, 14Z tetraenomic acid) 及び5-HPETE (5(S)-Hydroperoxyeicoso-6E, 8Z, 11Z, 14Z tetraenomic acid) はロイコトリエンなどの生理活性脂質が生じる過程での代謝中間体として広く理解されている。また、5-oxo-E TEや5-HPETEの好中球遊走活性が報告され、特に、5-oxo-E TEは、好酸球、単球、及び好中球等で合成され、少なくとも好酸球の組織への浸潤反応を起こし、また、PAF、LTB<sub>4</sub>、及びLTD<sub>4</sub>より強い遊走活性があると報告されている。5-oxo-E TEや5-HPETEの受容体の存在も示唆されているが、その具体的な生体内生理活性や受容体の実体は明らかではなく、これらは教科書レベルでは一般に生体内生理活性物質としては認識されていない。

#### 【0004】

他方、SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/frame0.html>) は蛋白質の一次構造からアミノ酸ごとの疎水性パラメーターなどを利用して、その膜貫通領域を予想するために開発されたプログラムである。すでに数多くの既知、および未知の蛋白質においてその構造予測に適應され、さらにゲノム遺伝子配列上で膜結合型蛋白質をコードする翻訳領域(ORF: open reading frame)を同定することなどに利用されている。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

GPCR及びその内在性リガンドは、これらに作用する薬剤の研究や、当該遺伝子及びその変異体の遺伝治療等への応用など、新たな治療法への応用の可能性が期待される。また、新規GPCR遺伝子の解析を通して新しい生体内情報伝達機構の発見や新規薬物標的蛋白質の同定も期待できる。本発明の課題は、生体内情報伝達機構の発見や新規薬物標的蛋白質の同定を可能とすることができる5-oxo-E TE受容体タンパク質やその遺伝子、5-oxo-E TE受容体のアゴニストやアンタゴニストを提供することにある。

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

これまでに5-oxo-E TEは好中球に対して正の走化性を誘導する物質であることが分かっていたが、その情報伝達を担う受容体の構造については不明であった。本発明者らはオーファンGPCRのリガンド探索法として、受容体とG $\alpha$ の融合蛋白質を用いる方法を考案した。本発明者らはヒトゲノム配列からG蛋白質共役受容体をコードすると思われる遺伝子を多数検索し、それらのいくつかをクローニングした。クローニングした遺伝子の3'末端部分にG i 1の $\alpha$ サブユニットの遺伝子を結合したものを作製し、これらを昆虫細胞に導入し、受容体-G i 1 $\alpha$ 融合タンパク質を発現させた。この融合タンパク質の受容体部分にアゴニストが結合するとG i 1 $\alpha$ の部分に[<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ Sが結合することが、受容体とGタンパク質の性質から期待できる。そこで作製した融合タンパク質の中に5-oxo-E TEの用量依存的に[<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ Sの結合を増加させるものがあるかどうか検索したところ、ある融合タンパク質の作製に利用された遺伝子は、5

5-oxo-E TEや5-HPETEに対する受容体の遺伝子であることを確認し、オーファンGPCRのひとつのリガンドが5-oxo-E TEであることを見出した。

【0007】

一方、このオーファンGPCRは、免疫系組織、血球系組織に高く発現しており、少なくとも各種リンパ球（ヘルパーT細胞、キラーT細胞、B細胞）、単球、好酸球、好塩基球、および等に発現していることも明らかにしている。これらの結果から、5-oxo-E TEは、免疫機能のこれら主役細胞に広範に作用する新しいタイプのケモカインと考えられる。今まで見出されているケモカインは内因性の白血球遊走・活性化作用を有する塩基性の強い、ヘパリン結合性活性ポリペプチドの総称であり、その構造から現在4つのサブファミリーに分けられている。今回、本発明者らが新たに見出したオーファンGPCRの内在性リガンド5-oxo-E TEは、他の脂質性の白血球遊走因子と同じくアラキドン酸代謝物であり、従来のペプチド性ケモカインとは別のタイプのケモカインと見なすことが出来る。

【0008】

上記融合タンパク質を用いた同様のアゴニストのスクリーニングから、5-oxo-E TEや5-HPETEに対する受容体には、5-oxo-E TEや5-HPETEが作用し、そのEC<sub>50</sub>はそれぞれ約1 nM、17 nMであることが分かった。また、これら5-oxo-E TEや5-HPETEだけでなく、5-HE TEやアラキドン酸もアゴニストとして作用し、アラキドン酸は高濃度においてアゴニスト活性を示した。さらにこの融合タンパク質について5-oxo-E TE存在下での[<sup>35</sup>S]-GTPγSの取込みを阻害するアンタゴニストを検索したところ、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、リノレン酸又はそれらの誘導体がアンタゴニストとして働くことが分かった。

本発明は、以上の知見に基づいて完成されるに至ったものである。

【0009】

すなわち本発明は、以下の(a)又は(b)の5-oxo-E TE受容体タンパク質をコードするDNA。(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質(請求項1)や、配列番号1に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含む5-oxo-E TE受容体タンパク質をコードするDNA(請求項2)や、請求項2記載のDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ5-oxo-E TE受容体タンパク質をコードするDNA(請求項3)や、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる5-oxo-E TE受容体タンパク質(請求項4)や、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる5-oxo-E TE受容体タンパク質(請求項5)や、請求項4又は5記載の5-oxo-E TE受容体タンパク質と、マーカータンパク質及び/又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質(請求項6)や、請求項4又は5記載の5-oxo-E TE受容体タンパク質に特異的に結合する抗5-oxo-E TE受容体抗体(請求項7)や、請求項4又は5記載の5-oxo-E TE受容体タンパク質を産生することができる発現系を含むDNA(請求項8)や、請求項4又は5記載の5-oxo-E TE受容体タンパク質を発現することができる発現系を含む宿主細胞(請求項9)や、請求項4又は5記載の5-oxo-E TE受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損し又は前記遺伝子が過剰発現する非ヒト動物(請求項10)や、請求項4若しくは5記載の5-oxo-E TE受容体タンパク質又は該5-oxo-E TE受容体タンパク質を発現している細胞膜と、被検物質とを用いることを特徴とする5-oxo-E TE受容体の機能促進若しくは抑制物質又は5-oxo-E TE受容体の発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法(請求項11)や、請求項4若しくは5記載の5-oxo-E TE受容体タンパク質又は5-oxo-E TE受容体タンパク質を発現している細胞膜と、5-oxo-E TEと、被検物質とを用いることを特徴とする5-oxo-E TE受容体の機能促進若しくは抑制物質又は5-oxo-E TE受容体の発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法(

請求項12)や、請求項4若しくは5記載の5-oxo-ETE受容体タンパク質を発現している細胞と、被検物質とを用いることを特徴とする5-oxo-ETE受容体の機能促進若しくは抑制物質又はG蛋白質共役受容体の発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法(請求項13)や、請求項10記載の非ヒト動物と、被検物質とを用いることを特徴とする5-oxo-ETE受容体の機能促進若しくは抑制物質又は5-oxo-ETE受容体の発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法(請求項14)や、非ヒト動物が、マウスであることを特徴とする請求項14記載の5-oxo-ETE受容体の機能促進若しくは抑制物質又は5-oxo-ETE受容体の発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法(請求項15)に関する。

#### 【0010】

また本発明は、5-oxo-ETE受容体のアゴニスト(請求項16)や、5-HETE又はアラキドン酸である請求項16記載のアゴニスト(請求項17)や、5-oxo-ETE受容体のアンタゴニスト(請求項18)や、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、リノレン酸又はそれらの誘導体である請求項18記載のアンタゴニスト(請求項19)や、5-oxo-ETE受容体の機能促進又は発現増強を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として、請求項4若しくは5記載の5-oxo-ETE受容体タンパク質、請求項16若しくは17記載のアゴニスト、又は請求項1～3のいずれか記載のDNAを含む医薬組成物(請求項20)や、5-oxo-ETE受容体の機能又は発現の抑制を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として、請求項18若しくは19記載のアンタゴニスト、又は請求項1～3のいずれか記載のDNAの発現を抑制するDNA若しくはRNAを含む医薬組成物(請求項21)や、検体中の5-oxo-ETE受容体タンパク質をコードするDNA配列を、請求項4若しくは5記載の5-oxo-ETE受容体タンパク質をコードするDNA配列と比較することを特徴とする5-oxo-ETE受容体の機能又は発現に関連する疾病の診断方法(請求項22)や、請求項4若しくは5記載の5-oxo-ETE受容体タンパク質をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部からなる5-oxo-ETE受容体の機能又は発現に関連する疾病の診断用プローブ(請求項23)や、請求項23記載の診断用プローブ及び/又は請求項7記載の抗体を含有する5-oxo-ETE受容体の機能又は発現に関連する疾病の診断薬(請求項24)に関する。

#### 【0011】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の5-oxo-ETE受容体タンパク質をコードするDNAとしては、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる5-oxo-ETE受容体タンパク質や、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる5-oxo-ETE受容体タンパク質をコードするDNAを挙げることができ、これら5-oxo-ETE受容体タンパク質をコードするDNAは、そのDNA配列情報等に基づき、例えばヒト由来の5-oxo-ETE受容体遺伝子においてはヒト遺伝子ライブラリーやヒトcDNAライブラリーなどから公知の方法により調製することができる。

#### 【0012】

また、本発明の5-oxo-ETE受容体タンパク質をコードするDNAとしては、配列番号1に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNAや、これらDNAをプローブとして、ヒト由来のDNAライブラリーに対してストリンジентな条件下でハイブリダイゼーションし、かつ5-oxo-ETE受容体タンパク質をコードするDNAを挙げることができる。かかるDNAを取得するためのハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、42℃でのハイブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による42℃での洗浄処理を挙げることができ、65℃でのハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による65℃での洗浄処理をより好ましく挙げることができる。

#### 【0013】

本発明の 5-oxo-ETE 受容体タンパク質としては、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる 5-oxo-ETE 受容体タンパク質や、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる 5-oxo-ETE に対するタンパク質や、これらの組換えタンパク質を具体的に挙げる事ができる。かかる 5-oxo-ETE 受容体タンパク質は、その DNA 配列情報等に基づき公知の方法で調製することができる。

#### 【0014】

上記配列番号 1 に示される塩基配列からなる 5-oxo-ETE 受容体タンパク質をコードする DNA の等価物として、配列番号 3 に示される塩基配列からなる DNA (31%)、配列番号 5 に示される塩基配列からなる DNA (31%)、配列番号 7 に示される塩基配列からなる DNA (32%)、又は配列番号 9 に示される塩基配列からなる DNA (3%) を挙げる事ができる (カッコ内の数値は配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA とのホモロジーを示す)。また、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる 5-oxo-ETE 受容体タンパク質の等価物として、配列番号 4、6、8 又は 10 にそれぞれ示されるアミノ酸配列からなる GPCR タンパク質を挙げる事ができる。

#### 【0015】

本発明の融合タンパク質とは、本発明の 5-oxo-ETE 受容体タンパク質に、マーカータンパク質及び/又はペプチドタグを結合させたものをいい、マーカータンパク質としては、従来知られているマーカータンパク質であればどのようなものでもよく、例えば、アルカリフォスファターゼ、抗体の Fc 領域、HRP、GFP などを具体的に挙げる事ができ、また本発明におけるペプチドタグとしては、Myc タグ、His タグ、FLAG タグ、GST タグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができる。かかる融合タンパク質は、常法により作製することができ、Ni-NTA と His タグの親和性を利用した 5-oxo-ETE 受容体タンパク質の精製や、5-oxo-ETE 受容体タンパク質の検出や、5-oxo-ETE 受容体タンパク質に対する抗体の定量や、その他当該分野の研究用試薬としても有用である。

#### 【0016】

本発明の抗 5-oxo-ETE 受容体抗体としては、5-oxo-ETE 受容体タンパク質に特異的に結合する抗体であればどのようなものでもよく、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げる事ができ、これらは上記 5-oxo-ETE 受容体タンパク質を抗原として用い、常法により作製することができるが、その中でもモノクローナル抗体がその特異性の点でより好ましい。かかるモノクローナル抗体等の 5-oxo-ETE 受容体タンパク質に特異的に結合する抗体は、例えば、5-oxo-ETE 受容体タンパク質の変異又は欠失に起因する疾病の診断や 5-oxo-ETE 受容体タンパク質の分子機構を明らかにする上で有用である。

#### 【0017】

上記 5-oxo-ETE 受容体タンパク質に対する抗体は、慣用のプロトコルを用いて、動物 (好ましくはヒト以外) に該 5-oxo-ETE 受容体タンパク質若しくはエピトープを含む断片、又は該タンパク質を膜表面に発現した細胞を投与することにより産生され、例えばモノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす、ハイブリドーマ法 (Nature 256, 495-497, 1975)、トリオーマ法、ヒト B 細胞ハイブリドーマ法 (Immunology Today 4, 72, 1983) 及び EBV-ハイブリドーマ法 (MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985) など任意の方法を用いることができる。以下に 5-oxo-ETE 受容体タンパク質として、マウス由来の 5-oxo-ETE 受容体タンパク質を例に挙げてマウス由来の 5-oxo-ETE 受容体タンパク質に対して特異的に結合するモノクローナル抗体、すなわち抗マウス 5-oxo-ETE 受容体モノクローナル抗体の作製方法を説明する。

## 【0018】

抗マウス5-oxo-E TE受容体モノクローナル抗体は、抗マウス5-oxo-E TE受容体モノクローナル抗体産生ハイブリドーマをインビボ又はインビトロで常法により培養することによって生産することができる。例えば、インビボ系においては、齧歯動物、好ましくはマウス又はラットの腹腔内で培養することにより、またインビトロ系においては、動物細胞培養用培地で培養することにより得ることができる。インビトロ系でハイブリドーマを培養するための培地としては、ストレプトマイシンやペニシリン等の抗生物質を含むRPMI 1640又はMEM等の細胞培養培地を例示することができる。

## 【0019】

抗マウス5-oxo-E TE受容体モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、例えば、マウス以外の動物種の5-oxo-E TE受容体タンパク質を用いてBALB/cマウスを免疫し、免疫されたマウスの脾臓細胞とマウスNS-1細胞(ATCC TIB-18)とを、常法により細胞融合させ、免疫蛍光染色パターンによりスクリーニングすることにより、抗マウス5-oxo-E TE受容体モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作出することができる。また、かかるモノクローナル抗体の分離・精製方法としては、タンパク質の精製に一般的に用いられる方法であればどのような方法でもよく、アフィニティークロマトグラフィー等の液体クロマトグラフィーを具体的に例示することができる。

## 【0020】

また、上記5-oxo-E TE受容体タンパク質に対する一本鎖抗体をつくるためには、一本鎖抗体の調製法(米国特許第4,946,778号)を適用することができる。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウス又は他の哺乳動物等を利用したり、上記抗体を用いて、その5-oxo-E TE受容体タンパク質を発現するクローンを単離・同定したり、アフィニティークロマトグラフィーでそのポリペプチドを精製することもできる。5-oxo-E TE受容体タンパク質に対する抗体は、5-oxo-E TE受容体タンパク質の分子機構を明らかにする上で有用である。

## 【0021】

また上記抗5-oxo-E TE受容体モノクローナル抗体等の抗体に、例えば、FITC(フルオレセインイソシアネート)又はテトラメチルローダミンイソシアネート等の蛍光物質や、<sup>125</sup>I、<sup>32</sup>P、<sup>14</sup>C、<sup>35</sup>S又は<sup>3</sup>H等のラジオアイソトープや、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ又はフィコエリトリン等の酵素で標識したものや、グリーン蛍光タンパク質(GFP)等の蛍光発光タンパク質などを融合させた融合タンパク質を用いることによって、上記5-oxo-E TE受容体タンパク質の機能解析を行うことができる。また免疫学的測定方法としては、RIA法、ELISA法、蛍光抗体法、プラーク法、スポット法、血球凝集反応法、オクタロニー法等の方法を挙げることができる。

## 【0022】

本発明はまた、上記5-oxo-E TE受容体タンパク質を産生することができる発現系を含むDNAや、5-oxo-E TE受容体タンパク質を発現することができる発現系を含む宿主細胞に関する。かかる5-oxo-E TE受容体タンパク質をコードする遺伝子DNAの宿主細胞への導入は、Davisら(BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986)及びSambrookら(MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989)などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transfection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング(scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)、感染等により行うことができる。そして、宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草

10

20

30

40

50



菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真菌細胞や、ドロソフィラ S 2、スポドプテラ S f 9 等の昆虫細胞や、L 細胞、CHO 細胞、COS 細胞、HeLa 細胞、C 1 2 7 細胞、BALB/c 3 T 3 細胞（ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む）、BHK 2 1 細胞、HEK 2 9 3 細胞、Bowes メラノーマ細胞、卵母細胞等の動植物細胞などを挙げる  
ことができる。

#### 【0023】

また、発現系としては、上記 5-oxo-ETE 受容体タンパク質を宿主細胞内で発現させることができる発現系であればどのようなものでもよく、染色体、エピソーム及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40 のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げる  
ことができる。これら発現系は、発現を起こさせるだけでなく、発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

#### 【0024】

上記発現系を含んでなる宿主細胞は、5-oxo-ETE 受容体タンパク質の製造に用いることができる。例えば上記宿主細胞を培養し、培養物から 5-oxo-ETE 受容体タンパク質を回収し精製することにより製造することができる。5-oxo-ETE 受容体タンパク質を細胞培養物から回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法、好ましくは、高速液体クロマトグラフィーが用いられる。特に、アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、抗 5-oxo-ETE 受容体モノクローナル抗体等の抗 5-oxo-ETE 受容体抗体を結合させたカラムや、上記 5-oxo-ETE 受容体に通常のペプチドタグを付加した場合は、このペプチドタグに親和性のある物質を結合したカラムを用いることにより、かかる 5-oxo-ETE 受容体を得ることができる。

#### 【0025】

本発明において、上記 5-oxo-ETE 受容体をコードする遺伝子が過剰発現する非ヒト動物とは、野生型非ヒト動物に比べてかかる 5-oxo-ETE 受容体タンパク質の発現レベルが上昇し、5-oxo-ETE 受容体タンパク質を大量に産生する非ヒト動物をいい、また、5-oxo-ETE 受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物とは、染色体上の 5-oxo-ETE 受容体タンパク質をコードする遺伝子の一部若しくは全部が破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により不活性化され、5-oxo-ETE 受容体タンパク質を発現する機能を失なった非ヒト動物をいう。そして、本発明における非ヒト動物としては、ウサギや、マウス、ラット等の齧歯目動物などの非ヒト動物を具体的に挙げる  
ことができるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0026】

ところで、メンデルの法則に従い出生してくるホモ接合体非ヒト動物には、5-oxo-ETE 受容体タンパク質欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型とが含まれ、これらホモ接合体非ヒト動物における欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型を同時に用いることによって個体レベルで正確な比較実験をすることができることから、野生型の非ヒト動物、すなわち 5-oxo-ETE 受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物と同種の動物、さらには同腹の動物を、種々の実験等の際して併用することが好ましい。かかる 5-oxo-ETE 受容体タンパク質をコードする遺伝子の機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物の作製方法を、5-oxo-ETE 受容体タンパク質のノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを例にとつ

て以下説明する。

【0027】

例えば、5-oxo-E TE受容体タンパク質をコードする遺伝子の機能が染色体上で欠損したマウス、すなわち5-oxo-E TE受容体タンパク質ノックアウトマウスは、マウス遺伝子ライブラリーからPCR等の方法により得られた遺伝子断片を用いて、上記5-oxo-E TE受容体タンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングし、スクリーニングされた5-oxo-E TE受容体タンパク質をコードする遺伝子を、ウイルスベクター等を用いてサブクローンし、DNAシーケンシングにより特定する。このクローンの5-oxo-E TE受容体タンパク質をコードする遺伝子の全部又は一部をpMC1ネオ遺伝子カセット等に置換し、3'末端側にジフテリアトキシンAフラグメント(DT-A)遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子等の遺伝子を導入することによって、ターゲットベクターを作製する。

10

【0028】

この作製されたターゲティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション(電気穿孔)法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G418やガンシクロビア(GANC)等の抗生物質により相同的組換えを起こしたES細胞を選択する。また、この選択されたES細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンブロット法等により確認することが好ましい。その確認されたES細胞のクローンをマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型のマウスとインタークロスさせると、ヘテロ接合体マウスを得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせることによって、本発明の5-oxo-E TE受容体タンパク質ノックアウトマウスを作製することができる。また、5-oxo-E TE受容体タンパク質ノックアウトマウスが生起しているかどうかを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスからRNAを単離してノーザンブロット法等により調べたり、またこのマウスの発現をウエスタンブロット法等により調べる方法がある。

20

【0029】

5-oxo-E TE受容体タンパク質のトランスジェニックマウスは、上記5-oxo-E TE受容体タンパク質をコードするcDNAにチキンβ-アクチン、マウスニューロフィラメント、SV40等のプロモーター、及びラビットβ-グロビン、SV40等のポリA又はイントロンを融合させて導入遺伝子を構築し、該導入遺伝子をマウス受精卵の前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、仮親のマウスの輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔マウスから前記cDNAを有する仔マウスを選択することによりかかるトランスジェニックマウスを創製することができる。また、cDNAを有する仔マウスの選択は、マウスの尻尾等より粗DNAを抽出し、導入した5-oxo-E TE受容体タンパク質をコードする遺伝子をプローブとするドットハイブリダイゼーション法や、特異的プライマーを用いたPCR法等により行うことができる。

30

【0030】

本発明はまた、5-oxo-E TE受容体のアゴニストやアンタゴニストに関する。5-oxo-E TE受容体のアゴニスト等の機能促進物質又は5-oxo-E TE受容体のアンタゴニスト等の機能抑制物質のスクリーニング方法としては、前記本発明の5-oxo-E TE受容体遺伝子の3'末端部分にG11のαサブユニットの遺伝子が結合したものを作製し、これらを昆虫細胞に導入し、5-oxo-E TE受容体タンパク質-G11α融合タンパク質を発現させ、この融合タンパク質の受容体部分にGDP及び<sup>35</sup>S-GTPγS存在下で各種リガンド候補化合物等の被検物質を作用させ、膜画分に取り込まれた<sup>35</sup>S-GTPγSの取り込み量を指標に、5-oxo-E TEに対するアゴニストやアンタゴニストのスクリーニングを行うことができる。また、上記スクリーニングの他の態様として、5-oxo-E TE受容体タンパク質又は5-oxo-E TE受容体タンパク質を発現している細胞膜と、被検物質とを用いる方法や、5-oxo-E TE受容体タンパク質又は5-oxo-E TE受容体タンパク質を発現している細胞膜と、5-oxo

40

50

x o o - E T E と、被検物質とを用いる方法や、5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質を発現している細胞と、被検物質とを用いる方法や、5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質のノックアウトマウスやトランスジェニックマウス等の非ヒト動物と、被検物質とを用いる方法等を挙げることができる。

#### 【0031】

上記5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質又は5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質を発現している細胞膜と被検物質とを用いたスクリーニング方法としては、5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質又は細胞膜表面に発現している5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質と被検物質とを接触せしめ、5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質又は細胞膜表面に発現している5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質と、被検物質との結合状態を測定評価する方法を挙げることができる。また、上記5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質又は5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質を発現している細胞膜と、5 - o x o o - E T E と、被検物質とを用いる方法としては、5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質又は細胞膜表面に発現している5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質と5 - o x o o - E T E と被検物質とを接触せしめ、5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質又は細胞膜表面に発現している5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質と、5 - o x o o - E T E との結合状態を測定評価する方法を挙げることができる。

#### 【0032】

上記5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質のノックアウトマウスやトランスジェニックマウス等の非ヒト動物と、被検物質とを用いる方法としては、かかる非ヒト動物から得られる5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質発現細胞と被検物質とをあらかじめインビトロで接触せしめた後、かかる5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質発現細胞を5 - o x o o - E T E の存在下で培養し、該5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質発現細胞における5 - o x o o - E T E に対する応答を測定・評価する方法や、前記非ヒト動物から得られる5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質発現細胞と5 - o x o o - E T E とをあらかじめインビトロで接触せしめた後、該5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質発現細胞を被検物質の存在下で培養し、該5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質発現細胞における5 - o x o o - E T E との結合状態等の5 - o x o o - E T E に対する応答を測定・評価する方法や、前記非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物から得られる5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質発現細胞を5 - o x o o - E T E の存在下で培養し、該5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質発現細胞における5 - o x o o - E T E に対する応答を測定・評価する方法を挙げることができる。

#### 【0033】

本発明の5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質のアゴニスト等の機能促進物質若しくは5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質のアンタゴニスト等の機能抑制物質や、5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質の発現促進物質若しくは発現抑制物質等は、上記スクリーニング方法により得ることができる。本発明の5 - o x o o - E T E 受容体のアゴニストとして、具体的に5 - H E T E、アラキドン酸等を挙げることができ、5 - o x o o - E T E 受容体のアンタゴニストとして、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、リノレン酸又はそれらの誘導体を挙げることができ、エイコサペンタエン酸の誘導体としては、具体的に5, 8, 11, 14 - E i c o s a t e t r a y n o i c a c i d、5, 8, 11 - E i c o s a t r i y n o i c a c i d、E i c o s a - 11 Z, 14 Z, 17 Z - t r i e n o i c a c i d、N - A c e t y l - S - g e r a n y l g e r a n y l - L - c y s t a i n e 等を挙げることができる。また、ドコサヘキサエン酸の誘導体としては、ドコサヘキサエン酸のエステル、アミド等を挙げることができる。

#### 【0034】

また、本発明の医薬組成物、特に、5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質の機能促進又は発現増強を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物としては、有効成分として5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質や、その部分ペプチドの他、前記5 - H P E T E 等のアゴニストなどの5 - o x o o - E T E 受容体タンパク質の機能促進物質や、5 -

o x o - E T E 受容体タンパク質の発現促進物質を含んでもものであれば特に制限されるものではなく、また、他方、5 - o x o - E T E 受容体の機能又は発現の抑制を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物としては、有効成分として5, 8, 11, 14 - E i c o s a t e t r a y n o i c a c i d 等のアンタゴニストなどの5 - o x o - E T E 受容体タンパク質の機能抑制物質や、前記本発明のDNAの発現を抑制するDNA若しくはRNAなどの発現抑制物質を含んでもものであれば特に制限されるものではなく、これら医薬組成物を医薬品として用いる場合は、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができる。これら医薬組成物は、5 - o x o - E T E 受容体の機能促進又は発現増強を必要としている疾病や、5 - o x o - E T E 受容体の機能又は発現の抑制を必要としている疾病の予防若しくは治療方法に用いることができる。またこれら予防若しくは治療方法においては、患者の性別・体重・症状に見合った適切な投与量の上記医薬組成物を、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができる他、スプレー剤の型で鼻孔内投与することもできる。

10

#### 【0035】

本発明の5 - o x o - E T E 受容体の機能又は発現に関連する疾病の診断方法としては、検体中の5 - o x o - E T E 受容体タンパク質をコードするDNA配列を、本発明の5 - o x o - E T E 受容体タンパク質をコードするDNA配列と比較する方法であればどのような方法でもよく、また、本発明の5 - o x o - E T E 受容体の機能又は発現に関連する疾病の診断用プローブとしては、前記本発明の5 - o x o - E T E 受容体タンパク質をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部からなるものであれば特に制限されるものではなく、本発明の5 - o x o - E T E 受容体の機能又は発現に関連する疾病の診断薬としては、上記診断用プローブや前記5 - o x o - E T E 受容体タンパク質を特異的に認識する抗体を含有するものであれば特に制限されるものではない。

20

#### 【0036】

##### 【実施例】

以下に、実施例を掲げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

30

##### 実施例A（材料と方法）

##### 〔ヒトゲノムデータからの推定GPCR遺伝子の抽出〕

解析が完了した配列（2000年8月8日現在のもの）を用いて、GPCR遺伝子の候補となりうるオープンリーディングフレーム（ORF：Open Reading Frame）を抽出し、SOSUIによる分析を行った。なお、今回用いたヒトゲノムデータには、同一の確定されていない配列を重複して含んでいるため、ヒトゲノム全体が約3 G塩基対であるのに対してこのデータは約4.5 G塩基対からなる。ヒトゲノムデータから、200～1500のアミノ酸残基をコードするDNAからなる約33万5千個のORFを抽出し、この中からDNAの繰り返し配列に由来すると思われるORFや不確定なアミノ酸が多いORFや、同じアミノ酸を20%以上含むORFを排除することによって約27万個のORFを得た。

40

#### 【0037】

##### 〔ホモロジー（BLAST）検索〕

上記約27万個のORFをSOSUIにより分析した結果、膜貫通領域を6～8個含むORFが7780個得られた。得られたGPCR候補7780個のORFの配列を、BLASTを用いて2000年8月20日現在のデータベース“nr”と照会し、既知のGPCRとの相同性を調べてみた結果、既知のGPCRとホモロジーを持つものが1714個得られた。さらにこれらの配列から重複したものを除くことによって、既知の嗅覚受容体遺伝子41種類と、既知の味覚受容体遺伝子11種類と、嗅覚受容体や味覚受容体以外の既

50

知のGPCR遺伝子128種類を同定することができた。一方、新規の嗅覚受容体遺伝子281種類、新規の味覚受容体遺伝子11種類、嗅覚受容体や味覚受容体以外の新規なGPCR遺伝子を50個同定した。

#### 【0038】

[ヒトゲノムからのGPCR遺伝子のクローニング]

PCR法を用いてこれら新規GPCR遺伝子をヒトゲノムDNA (genomic DNA) からクローニングした。PCR増幅の条件としては、始めに98℃で1分間変性させた後、98℃で30秒間変性させ、65℃で30秒間アニーリングし、74℃で90秒間伸長反応させるというサイクルを30回繰返し、最後に74℃で3分間伸長反応を行い、その後4℃にてストックした。プライマーとしては、F: 5'-AAAGCGGCCCGCATGTGTGTGTCACCGTGGTGGCC-3' (配列番号11)とR: 5'-GGCGCTCAGCGTACAGCCCATGCCCTGGGAGGAGCCCTTCC-3' (配列番号12)を用い、またPCR反応液として以下(表1)の組成のものを用いた。

#### 【0039】

##### 【表1】

Primer F(20pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Primer R(20pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
genomicDNA(1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
KOD-plus	0.2 $\mu$ l
10X KOD buffer	2 $\mu$ l
dNTP(2mM)	2 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub>	1.6 $\mu$ l
milli-Q water	11.2 $\mu$ l
	20 $\mu$ l

#### 【0040】

さらにそこから終止コドンを除いた配列とGilaサブユニットの遺伝子(FEBS Lett. 197, 1-2, 305-310, 1986)との融合遺伝子を作製し、バキュロウイルスベクターpFASTBacに組み込んだ。この融合遺伝子をもったウイルスを昆虫細胞Sf9(ATCC CRL-1711)に感染させ、GPCR-Gila融合タンパク質を発現させた。細胞を回収し、膜画分を調整して、本発明者らが作製したGilaに対する抗体でウェスタンブロッティングを行い、融合タンパク質の発現を確認した。

#### 【0041】

[アゴニスト活性物質のスクリーニング]

融合タンパク質にGDPおよび[<sup>35</sup>S]-GTPγS存在下で各種リガンド候補化合物を作用させ、膜画分に取り込まれた[<sup>35</sup>S]-GTPγSの取り込み量を指標に、各GPCRに対するアゴニストのスクリーニングを行った。化合物にアゴニスト活性がある場合は化合物がGPCRに結合し、結果としてGilaが活性化されるので[<sup>35</sup>S]-GTPγSの取り込み量が上昇する。各種リガンド候補物質として約1000種類の化学物質を検索し、96穴プレートの放射活性を自動測定できるパッカード社の液体シンチレーションカウンター「トップカウント」を用いてハイスループットスクリーニングを行った。

#### 【0042】

[5-oxo-ETE受容体の発現部位]

以上のスクリーニングとは別に、各GPCRに対して各種臓器から調整したmRNAを鋳

型に R T - P C R を行い、発現部位の分布を調べた。プライマーとしては、F ; 5' - A A A G C G G C C G C A T G T T G T G T C A C C G T G G T G G C C - 3' (配列番号 11) と R ; 5' - G G C G C T C A G C G T A C A G C C C A T G C C C T G G G A G G A G C C T T C C T - 3' (配列番号 12) を用い、P C R 増幅の条件としては、始めに 98℃ で 1 分間変性させた後、98℃ で 30 秒間変性させ、65℃ で 30 秒間アニーリングし、74℃ で 90 秒間伸長反応させるというサイクルを 30 回繰返し、最後に 74℃ で 3 分間伸長反応を行い、その後 4℃ にてストックした。また P C R 反応液として以下の組成のものをを用いた。

【0043】

【表 2】

Primer F (20pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Primer R (20pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
cDNA	1 $\mu$ l
KOD-plus	0.2 $\mu$ l
10 $\times$ KOD buffer	2 $\mu$ l
dNTP (2mM)	2 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub>	1.6 $\mu$ l
milli-Q water	11.2 $\mu$ l
	20 $\mu$ l

10

20

【0044】

実施例 B (結果)

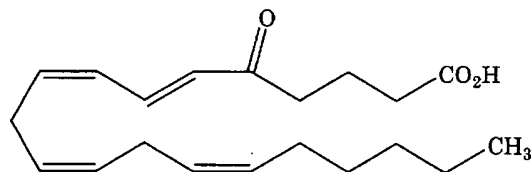
〔アゴニストのスクリーニング〕

上記スクリーニングにより、TH24-G1 と命名した特定の融合タンパク質に対して 5-oxo-ETE [化1]、5-HPETE [化2]、5-HETE [化3]、アラキドン酸などがアゴニストとしての活性を持つことがわかった (図1)。各化合物のおおよその EC<sub>50</sub> は、アラキドン酸；約  $1 \times 10^{-6}$  M、5-HETE；約  $1 \times 10^{-6}$  M、5-HPETE；約  $3 \times 10^{-8}$  M、5-oxo-ETE；約  $4 \times 10^{-9}$  M であったことから、TH24 のアミノ酸配列をもつ受容体を 5-oxo-ETE 受容体と同定した。

30

【0045】

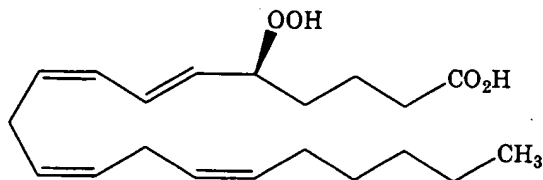
【化1】



40

【0046】

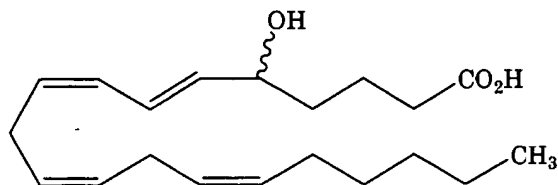
【化2】



【0047】

【化3】

10



【0048】

これらの物質をTH24-Gi融合タンパク質に作用させるとGi1α部分のGDPに対する親和性を減少させることが確認できた。5-HPETEを用いたときの結果をリガンドが存在しない対照(-)ligandと共に図2に示す。これは5-HPETE等の物質が5-oxo-EETE受容体に対してアゴニスト活性を持つことを支持するものである。

20

【0049】

〔アンタゴニストのスクリーニング〕

さらに5-oxo-EETEを用いて5-oxo-EETE受容体に対するアンタゴニストのスクリーニングを行った。その結果、高濃度(約 $1 \times 10^{-5}$  M以上)であればアラキドン酸よりさらに炭素鎖の長いエイコサペンタエン酸やその誘導体であるeicosatrienoic acid (5, 8, 11-Eicosatrienoic acid)、ドコサヘキサエン酸などの他、α-リノレン酸(linolenic acid)もアンタゴニストとして働くことがわかった(図3)。これはこれらの脂肪酸がアラキドン酸と類似する構造をもつ一方で、5-HPETE、5-oxo-EETE、5-HETEに共通な5位の酸素を持たないことを考えると妥当な結果である。今後、5位に過酸化酸素やカルボニル酸素を導入した化合物は極めて有用な5-oxo-EETE受容体に対するアンタゴニストとして働くことが期待できる。

30

【0050】

〔5-oxo-EETE受容体の発現分布〕

5-oxo-EETE受容体の発現分布をRT-PCRで確認した結果は、広く全身に発現しているものの、肝臓や結腸などに比較的強く発現していることがわかった(図4)。RT-PCRの結果では5-oxo-EETE受容体は全身に発現しているとの結果を得たが、おそらくその活性の性質や他の活性脂質の特性との類似性から、リンパ球、特に好中球に発現して機能していると推察される。我々の予備的な実験もそれを支持しているが、一方で臓器の細胞自身が5-oxo-EETE受容体を発現している可能性も依然として考えるべきである。

40

【0051】

〔まとめ〕

以上のことから5-HPETE、5-oxo-EETEに対する受容体の存在が可能性として示唆されてきたが、今回見出された5-oxo-EETE受容体が、5-oxo-EETEや5-HPETEに対する生体内受容体である可能性が極めて高い。[<sup>35</sup>S]-GTP

50

$\gamma$  S 結合活性から測定した  $EC_{50}$  の値が、これまで報告されている 5-oxo-ETE や 5-HPETE の生理活性の  $EC_{50}$  の値とよく一致することもその理由の一つとして挙げることができる。

【0052】

【発明の効果】

本発明により新しく同定された 5-oxo-ETE 受容体は、5-oxo-ETE や 5-HPETE の好中球遊走活性を調節していると考えられることから、5-oxo-ETE や 5-HPETE の他そのアゴニストなどの 5-oxo-ETE 受容体の作動剤や、5-oxo-ETE 受容体のアンタゴニストなどの作動抑制剤は、各種免疫系細胞の遊走を活性化・不活性化することで、主に免疫系全般の腑活化・失活化を行う可能性があり、炎症

10

【0053】

【配列表】



## SEQUENCE LISTING

(110) JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

(120) 5-oxo-ETE receptor proteins and its genes

10

(130) A011P46

(140)

(141)

(160) 12

20

(170) PatentIn Ver. 2.1

(210) 1

(211) 1272

(212) DNA

(213) Homo sapiens

30

(220)

(221) CDS

(222) (1)..(1272)

(300)

(400) 1

40

atg ttg tgt cac cgt ggt ggc cag ctg ata gtg cca atc atc cca ctt 48

Met Leu Cys His Arg Gly Gly Gln Leu Ile Val Pro Ile Ile Pro Leu

1

5

10

15

tgc cct gag cac tcc tgc agg ggt aga aga ctc cag aac ctt ctc tca 96

Cys Pro Glu His Ser Cys Arg Gly Arg Arg Leu Gln Asn Leu Leu Ser

20

25

30

10

ggc cca tgg ccc aag cag ccc atg gaa ctt cat aac ctg agc tct cca 144

Gly Pro Trp Pro Lys Gln Pro Met Glu Leu His Asn Leu Ser Ser Pro

35

40

45

tct ccc tct ctc tcc tcc tct gtt ctc cct ccc tcc ttc tct ccc tca 192

Ser Pro Ser Leu Ser Ser Ser Val Leu Pro Pro Ser Phe Ser Pro Ser

50

55

60

20

ccc tcc tct gct ccc tct gcc ttt acc act gtc ggc ggc tcc tct gga 240

Pro Ser Ser Ala Pro Ser Ala Phe Thr Thr Val Gly Gly Ser Ser Gly

65

70

75

80

ggg ccc tgc cac ccc acc tct tcc tgc ctg gtc tct gcc ttc ctg gca 288

Gly Pro Cys His Pro Thr Ser Ser Ser Leu Val Ser Ala Phe Leu Ala

85

90

95

30

cca atc ctg gcc ctg gag ttt gtc ctg ggc ctg gtc ggc aac agt ttg 336

Pro Ile Leu Ala Leu Glu Phe Val Leu Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu

100

105

110

gcc ctc ttc atc ttc tgc atc cac acg cgg ccc tgg acc tcc aac acg 384

Ala Leu Phe Ile Phe Cys Ile His Thr Arg Pro Trp Thr Ser Asn Thr

40

115	120	125		
gtg ttc ctg gtc agc ctg gtg gcc gct gac ttc ctc ctg atc agc aac	432			
Val Phe Leu Val Ser Leu Val Ala Ala Asp Phe Leu Leu Ile Ser Asn				
130	135	140		
ctg ccc ctc cgc gtg gac tac tac ctc ctc cat gag acc tgg cgc ttt	480		10	
Leu Pro Leu Arg Val Asp Tyr Tyr Leu Leu His Glu Thr Trp Arg Phe				
145	150	155	160	
ggg gct gct gcc tgc aaa gtc aac ctc ttc atg ctg tcc acc aac cgc	528			
Gly Ala Ala Ala Cys Lys Val Asn Leu Phe Met Leu Ser Thr Asn Arg				
165	170	175		20
acg gcc agc gtt gtc ttc ctc aca gcc atc gca ctc aac cgc tac ctg	576			
Thr Ala Ser Val Val Phe Leu Thr Ala Ile Ala Leu Asn Arg Tyr Leu				
180	185	190		
aag gtg gtg cag ccc cac cac gtg ctg agc cgt gct tcc gtg ggg gca	624			
Lys Val Val Gln Pro His His Val Leu Ser Arg Ala Ser Val Gly Ala				
195	200	205		30
gct gcc cgg gtg gcc ggg gga ctc tgg gtg ggc atc ctg ctc ctc aac	672			
Ala Ala Arg Val Ala Gly Gly Leu Trp Val Gly Ile Leu Leu Leu Asn				
210	215	220		
ggg cac ctg ctc ctg agc acc ttc tcc ggc ccc tcc tgc ctc agc tac	720			
Gly His Leu Leu Leu Ser Thr Phe Ser Gly Pro Ser Cys Leu Ser Tyr				40
225	230	235	240	

agg gtg ggc acg aag ccc tcg gcc tcg ctc cgc tgg cac cag gca ctg 768  
 Arg Val Gly Thr Lys Pro Ser Ala Ser Leu Arg Trp His Gln Ala Leu

245

250

255

tac ctg ctg gag ttc ttc ctg cca ctg gcg ctc atc ctc ttt gct att 816  
 Tyr Leu Leu Glu Phe Phe Leu Pro Leu Ala Leu Ile Leu Phe Ala Ile

260

265

270

10

gtg agc att ggg ctc acc atc cgg aac cgt ggt ctg ggc ggg cag gca 864  
 Val Ser Ile Gly Leu Thr Ile Arg Asn Arg Gly Leu Gly Gly Gln Ala

275

280

285

ggc ccg cag agg gcc atg cgt gtg ctg gcc atg gtg gtg gcc gtc tac 912  
 Gly Pro Gln Arg Ala Met Arg Val Leu Ala Met Val Val Ala Val Tyr

290

295

300

20

acc atc tgc ttc ttg ccc agc atc atc ttt ggc atg gct tcc atg gtg 960  
 Thr Ile Cys Phe Leu Pro Ser Ile Ile Phe Gly Met Ala Ser Met Val

305

310

315

320

30

gct ttc tgg ctg tcc gcc tgc cga tcc ctg gac ctc tgc aca cag ctc 1008  
 Ala Phe Trp Leu Ser Ala Cys Arg Ser Leu Asp Leu Cys Thr Gln Leu

325

330

335

ttc cat ggc tcc ctg gcc ttc acc tac ctc aac agt gtc ctg gac ccc 1056  
 Phe His Gly Ser Leu Ala Phe Thr Tyr Leu Asn Ser Val Leu Asp Pro

340

345

350

40

gtg ctc tac tgc ttc tct agc ccc aac ttc ctc cac cag agc cgg gcc 1104  
 Val Leu Tyr Cys Phe Ser Ser Pro Asn Phe Leu His Gln Ser Arg Ala  
 355 360 365

tig ctg ggc ctc acg cgg ggc cgg cag ggc cca gtg agc gac gag agc 1152  
 Leu Leu Gly Leu Thr Arg Gly Arg Gln Gly Pro Val Ser Asp Glu Ser  
 370 375 380

10

tcc tac caa ccc tcc agg cag tgg cgc tac cgg gag gcc tct agg aag 1200  
 Ser Tyr Gln Pro Ser Arg Gln Trp Arg Tyr Arg Glu Ala Ser Arg Lys  
 385 390 395 400

gcg gag gcc ata ggg aag ctg aaa gtg cag ggc gag gtc tct ctg gaa 1248  
 Ala Glu Ala Ile Gly Lys Leu Lys Val Gln Gly Glu Val Ser Leu Glu  
 405 410 415

20

aag gaa ggc tcc tcc cag ggc tga 1272  
 Lys Glu Gly Ser Ser Gln Gly  
 420

30

<210> 2

<211> 423

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Cys His Arg Gly Gly Gln Leu Ile Val Pro Ile Ile Pro Leu  
 1 5 10 15

40

Cys Pro Glu His Ser Cys Arg Gly Arg Arg Leu Gln Asn Leu Leu Ser  
                   20                                  25                                  30  
 Gly Pro Trp Pro Lys Gln Pro Met Glu Leu His Asn Leu Ser Ser Pro  
                   35                                  40                                  45  
 Ser Pro Ser Leu Ser Ser Ser Val Leu Pro Pro Ser Phe Ser Pro Ser  
                   50                                  55                                  60  
 Pro Ser Ser Ala Pro Ser Ala Phe Thr Thr Val Gly Gly Ser Ser Gly  
                   65                                  70                                  75                                  80  
 Gly Pro Cys His Pro Thr Ser Ser Ser Leu Val Ser Ala Phe Leu Ala  
                                   85                                  90                                  95  
 Pro Ile Leu Ala Leu Glu Phe Val Leu Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu  
                   100                                  105                                  110  
 Ala Leu Phe Ile Phe Cys Ile His Thr Arg Pro Trp Thr Ser Asn Thr  
                   115                                  120                                  125  
 Val Phe Leu Val Ser Leu Val Ala Ala Asp Phe Leu Leu Ile Ser Asn  
                   130                                  135                                  140  
 Leu Pro Leu Arg Val Asp Tyr Tyr Leu Leu His Glu Thr Trp Arg Phe  
                   145                                  150                                  155                                  160  
 Gly Ala Ala Ala Cys Lys Val Asn Leu Phe Met Leu Ser Thr Asn Arg  
                                   165                                  170                                  175  
 Thr Ala Ser Val Val Phe Leu Thr Ala Ile Ala Leu Asn Arg Tyr Leu  
                   180                                  185                                  190  
 Lys Val Val Gln Pro His His Val Leu Ser Arg Ala Ser Val Gly Ala  
                   195                                  200                                  205  
 Ala Ala Arg Val Ala Gly Gly Leu Trp Val Gly Ile Leu Leu Leu Asn  
                   210                                  215                                  220  
 Gly His Leu Leu Leu Ser Thr Phe Ser Gly Pro Ser Cys Leu Ser Tyr  
                   225                                  230                                  235                                  240  
 Arg Val Gly Thr Lys Pro Ser Ala Ser Leu Arg Trp His Gln Ala Leu

10

20

30

40

245                      250                      255  
 Tyr Leu Leu Glu Phe Phe Leu Pro Leu Ala Leu Ile Leu Phe Ala Ile  
 260                      265                      270  
 Val Ser Ile Gly Leu Thr Ile Arg Asn Arg Gly Leu Gly Gly Gln Ala  
 275                      280                      285  
 Gly Pro Gln Arg Ala Met Arg Val Leu Ala Met Val Val Ala Val Tyr  
 290                      295                      300  
 Thr Ile Cys Phe Leu Pro Ser Ile Ile Phe Gly Met Ala Ser Met Val  
 305                      310                      315                      320  
 Ala Phe Trp Leu Ser Ala Cys Arg Ser Leu Asp Leu Cys Thr Gln Leu  
 325                      330                      335  
 Phe His Gly Ser Leu Ala Phe Thr Tyr Leu Asn Ser Val Leu Asp Pro  
 340                      345                      350  
 Val Leu Tyr Cys Phe Ser Ser Pro Asn Phe Leu His Gln Ser Arg Ala  
 355                      360                      365  
 Leu Leu Gly Leu Thr Arg Gly Arg Gln Gly Pro Val Ser Asp Glu Ser  
 370                      375                      380  
 Ser Tyr Gln Pro Ser Arg Gln Trp Arg Tyr Arg Glu Ala Ser Arg Lys  
 385                      390                      395                      400  
 Ala Glu Ala Ile Gly Lys Leu Lys Val Gln Gly Glu Val Ser Leu Glu  
 405                      410                      415  
 Lys Glu Gly Ser Ser Gln Gly  
 420

10

20

30

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1164

&lt;212&gt; DNA

40

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1164)

<400> 3

10

atg aat cgg cac cat ctg cag gat cac ttt ctg gaa ata gac aag aag 48  
Met Asn Arg His His Leu Gln Asp His Phe Leu Glu Ile Asp Lys Lys  
1 5 10 15

aac tgc tgt gtg ttc cga gat gac ttc att gcc aag gtg ttg ccg ccg 96  
Asn Cys Cys Val Phe Arg Asp Asp Phe Ile Ala Lys Val Leu Pro Pro  
20 25 30

20

gtg ttg ggg ctg gag ttt atc ttt ggg ctt ctg ggc aat ggc ctt gcc 144  
Val Leu Gly Leu Glu Phe Ile Phe Gly Leu Leu Gly Asn Gly Leu Ala  
35 40 45

ctg tgg att ttc tgt ttc cac ctc aag tcc tgg aaa tcc agc cgg att 192  
Leu Trp Ile Phe Cys Phe His Leu Lys Ser Trp Lys Ser Ser Arg Ile  
50 55 60

30

ttc ctg ttc aac ctg gca gta gct gac ttt cta ctg atc atc tgc ctg 240  
Phe Leu Phe Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu Ile Ile Cys Leu  
65 70 75 80

ccg ttc gtg atg gac tac tat gtg cgg cgt tca gac tgg aag ttt ggg 288  
Pro Phe Val Met Asp Tyr Tyr Val Arg Arg Ser Asp Trp Lys Phe Gly

40



85	90	95	
gac atc cct tgc cgg ctg gtg ctc ttc atg ttt gcc atg aac cgc cag			336
Asp Ile Pro Cys Arg Leu Val Leu Phe Met Phe Ala Met Asn Arg Gln			
100	105	110	
ggc agc atc ata ttc ctc acg gtg gtg gcg gta gac agg tat ttc cgg			384
Gly Ser Ile Ile Phe Leu Thr Val Val Ala Val Asp Arg Tyr Phe Arg			10
115	120	125	
gtg gtc cat ccc cac cac gcc ctg aac aag atc tcc aat tgg aca gca			432
Val Val His Pro His His Ala Leu Asn Lys Ile Ser Asn Trp Thr Ala			
130	135	140	20
gcc atc atc tct tgc ctt ctg tgg ggc atc act gtt ggc cta aca gtc			480
Ala Ile Ile Ser Cys Leu Leu Trp Gly Ile Thr Val Gly Leu Thr Val			
145	150	155	160
cac ctc ctg aag aag aag ttg ctg atc cag aat ggc act gca aat gtg			528
His Leu Leu Lys Lys Lys Leu Leu Ile Gln Asn Gly Thr Ala Asn Val			
165	170	175	30
tgc atc agc ttc agc atc tgc cat acc ttc cgg tgg cac gaa gct atg			576
Cys Ile Ser Phe Ser Ile Cys His Thr Phe Arg Trp His Glu Ala Met			
180	185	190	
ttc ctc ctg gag ttc ttc ctg ccc ctg ggc atc atc ctg ttc tgc tca			624
Phe Leu Leu Glu Phe Phe Leu Pro Leu Gly Ile Ile Leu Phe Cys Ser			40
195	200	205	

gcc aga att atc tgg agc ctg cgg cag aga caa atg gac cgg cat gcc 672  
 Ala Arg Ile Ile Trp Ser Leu Arg Gln Arg Gln Met Asp Arg His Ala  
 210 215 220

aag atc aag aga gcc atc acc ttc atc atg gtc gtc gcc atc gtc ttt 720  
 Lys Ile Lys Arg Ala Ile Thr Phe Ile Met Val Val Ala Ile Val Phe  
 225 230 235 240

10

gtc atc tgc ttc ctt ccc agc gtg gtt gtc cgg atc cac atc ttc tgg 768  
 Val Ile Cys Phe Leu Pro Ser Val Val Val Arg Ile His Ile Phe Trp  
 245 250 255

ctc ctg cac act tcg ggc acg cag aat tgt gaa gtg tac cgc tcg gtg 816  
 Leu Leu His Thr Ser Gly Thr Gln Asn Cys Glu Val Tyr Arg Ser Val  
 260 265 270

20

gac ctg gcg ttc ttt atc act ctc agc ttc acc tac atg aac agc atg 864  
 Asp Leu Ala Phe Phe Ile Thr Leu Ser Phe Thr Tyr Met Asn Ser Met  
 275 280 285

30

ctg gac ccc gtg gtg tac tac ttc tcc agc cca tcc ttt ccc aac ttc 912  
 Leu Asp Pro Val Val Tyr Tyr Phe Ser Ser Pro Ser Phe Pro Asn Phe  
 290 295 300

ttc tcc act ttg atc aac cgc tgc ctc cag agg aag ata aca ggt gag 960  
 Phe Ser Thr Leu Ile Asn Arg Cys Leu Gln Arg Lys Ile Thr Gly Glu  
 305 310 315 320

40

cca gat aat aac cgc agc acg agc gtc gag ctc aca ggc gac ccc aac 1008  
 Pro Asp Asn Asn Arg Ser Thr Ser Val Glu Leu Thr Gly Asp Pro Asn  
 325 330 335

aaa acc aga ggc gct cca gag gcg tta atc gcc aac tcc ggt gag cca 1056  
 Lys Thr Arg Gly Ala Pro Glu Ala Leu Ile Ala Asn Ser Gly Glu Pro  
 340 345 350

10

tgg agc ccc tct tat ctg ggc cca acc tca aat aac cat tcc aag aag 1104  
 Trp Ser Pro Ser Tyr Leu Gly Pro Thr Ser Asn Asn His Ser Lys Lys  
 355 360 365

gga cat tgt cac caa gaa cca gca tct ctg gag aaa cag ttg ggc tgt 1152  
 Gly His Cys His Gln Glu Pro Ala Ser Leu Glu Lys Gln Leu Gly Cys  
 370 375 380

20

tgc atc gag taa 1164  
 Cys Ile Glu  
 385

30

<210> 4

<211> 387

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Asn Arg His His Leu Gln Asp His Phe Leu Glu Ile Asp Lys Lys  
 1 5 10 15

40

Asn Cys Cys Val Phe Arg Asp Asp Phe Ile Ala Lys Val Leu Pro Pro  
                   20                                  25                                  30  
 Val Leu Gly Leu Glu Phe Ile Phe Gly Leu Leu Gly Asn Gly Leu Ala  
                   35                                  40                                  45  
 Leu Trp Ile Phe Cys Phe His Leu Lys Ser Trp Lys Ser Ser Arg Ile  
                   50                                  55                                  60  
 Phe Leu Phe Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu Ile Ile Cys Leu  
                   65                                  70                                  75                                  80  
 Pro Phe Val Met Asp Tyr Tyr Val Arg Arg Ser Asp Trp Lys Phe Gly  
                                   85                                  90                                  95  
 Asp Ile Pro Cys Arg Leu Val Leu Phe Met Phe Ala Met Asn Arg Gln  
                   100                                  105                                  110  
 Gly Ser Ile Ile Phe Leu Thr Val Val Ala Val Asp Arg Tyr Phe Arg  
                   115                                  120                                  125  
 Val Val His Pro His His Ala Leu Asn Lys Ile Ser Asn Trp Thr Ala  
                   130                                  135                                  140  
 Ala Ile Ile Ser Cys Leu Leu Trp Gly Ile Thr Val Gly Leu Thr Val  
                   145                                  150                                  155                                  160  
 His Leu Leu Lys Lys Lys Leu Leu Ile Gln Asn Gly Thr Ala Asn Val  
                                   165                                  170                                  175  
 Cys Ile Ser Phe Ser Ile Cys His Thr Phe Arg Trp His Glu Ala Met  
                   180                                  185                                  190  
 Phe Leu Leu Glu Phe Phe Leu Pro Leu Gly Ile Ile Leu Phe Cys Ser  
                   195                                  200                                  205  
 Ala Arg Ile Ile Trp Ser Leu Arg Gln Arg Gln Met Asp Arg His Ala  
                   210                                  215                                  220  
 Lys Ile Lys Arg Ala Ile Thr Phe Ile Met Val Val Ala Ile Val Phe  
                   225                                  230                                  235                                  240  
 Val Ile Cys Phe Leu Pro Ser Val Val Val Arg Ile His Ile Phe Trp

10

20

30

40

245                      250                      255  
 Leu Leu His Thr Ser Gly Thr Gln Asn Cys Glu Val Tyr Arg Ser Val  
 260                      265                      270  
 Asp Leu Ala Phe Phe Ile Thr Leu Ser Phe Thr Tyr Met Asn Ser Met  
 275                      280                      285  
 Leu Asp Pro Val Val Tyr Tyr Phe Ser Ser Pro Ser Phe Pro Asn Phe  
 290                      295                      300  
 Phe Ser Thr Leu Ile Asn Arg Cys Leu Gln Arg Lys Ile Thr Gly Glu  
 305                      310                      315                      320  
 Pro Asp Asn Asn Arg Ser Thr Ser Val Glu Leu Thr Gly Asp Pro Asn  
 325                      330                      335  
 Lys Thr Arg Gly Ala Pro Glu Ala Leu Ile Ala Asn Ser Gly Glu Pro  
 340                      345                      350  
 Trp Ser Pro Ser Tyr Leu Gly Pro Thr Ser Asn Asn His Ser Lys Lys  
 355                      360                      365  
 Gly His Cys His Gln Glu Pro Ala Ser Leu Glu Lys Gln Leu Gly Cys  
 370                      375                      380  
 Cys Ile Glu  
 385

10

20

30

(210) 5  
 (211) 1041  
 (212) DNA  
 (213) Homo sapiens

(220)  
 (221) CDS

40

(222) (1)..(1041)

(400) 5

atg tac aac ~~ggg~~ tgc tgc tgc cgc atc gag ~~ggg~~ gac acc atc tcc cag 48

Met Tyr Asn Gly Ser Cys Cys Arg Ile Glu Gly Asp Thr Ile Ser Gln

1

5

10

15

10

gtg atg ccg ccg ctg ctc att gtg gcc ttt gtg ctg ggc gca cta ggc 96

Val Met Pro Pro Leu Leu Ile Val Ala Phe Val Leu Gly Ala Leu Gly

20

25

30

aat ~~ggg~~ gtc gcc ctg tgt ggt ttc tgc ttc cac atg aag acc tgg aag 144

Asn Gly Val Ala Leu Cys Gly Phe Cys Phe His Met Lys Thr Trp Lys

35

40

45

20

ccc agc act gtt tac ctt ttc aat ttg gcc gtg gct gat ttc ctc ctt 192

Pro Ser Thr Val Tyr Leu Phe Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu

50

55

60

atg atc tgc ctg cct ttt cgg aca gac tat tac ctc aga cgt aga cac 240

Met Ile Cys Leu Pro Phe Arg Thr Asp Tyr Tyr Leu Arg Arg Arg His

65

70

75

80

30

tgg gct ttt ~~ggg~~ gac att ccc tgc cga gtg ~~ggg~~ ctc ttc acg ttg gcc 288

Trp Ala Phe Gly Asp Ile Pro Cys Arg Val Gly Leu Phe Thr Leu Ala

85

90

95

atg aac agg gcc ~~ggg~~ agc atc gtg ttc ctt acg gtg gtg gct gcg gac 336

Met Asn Arg Ala Gly Ser Ile Val Phe Leu Thr Val Val Ala Ala Asp

40

100	105	110	
agg tat ttc aaa gtg gtc cac ccc cac cac gcg gtg aac act atc tcc			384
Arg Tyr Phe Lys Val Val His Pro His His Ala Val Asn Thr Ile Ser			
115	120	125	
acc cgg gtg gcg gct ggc atc gtc tgc acc ctg tgg gcc ctg gtc atc			432
Thr Arg Val Ala Ala Gly Ile Val Cys Thr Leu Trp Ala Leu Val Ile			10
130	135	140	
ctg gga aca gtg tat ctt ttg ctg gag aac cat ctc tgc gtg caa gag			480
Leu Gly Thr Val Tyr Leu Leu Leu Glu Asn His Leu Cys Val Gln Glu			
145	150	155	160
			20
acg gcc gtc tcc tgt gag agc ttc atc atg gag tcg gcc aat ggc tgg			528
Thr Ala Val Ser Cys Glu Ser Phe Ile Met Glu Ser Ala Asn Gly Trp			
165	170	175	
cat gac atc atg ttc cag ctg gag ttc ttt atg ccc ctc ggc atc atc			576
His Asp Ile Met Phe Gln Leu Glu Phe Phe Met Pro Leu Gly Ile Ile			
180	185	190	30
tta ttt tgc tcc ttc aag att gtt tgg agc ctg agg cgg agg cag cag			624
Leu Phe Cys Ser Phe Lys Ile Val Trp Ser Leu Arg Arg Arg Gln Gln			
195	200	205	
ctg gcc aga cag gct cgg atg aag aag gcg acc cgg ttc atc atg gtg			672
Leu Ala Arg Gln Ala Arg Met Lys Lys Ala Thr Arg Phe Ile Met Val			40
210	215	220	

10

20

30

40

agg agt tgc atc agt gtg gca aat agt ttc caa agc cag tct gat ggg 1008  
Arg Ser Cys Ile Ser Val Ala Asn Ser Phe Gln Ser Gln Ser Asp Gly  
325 330 335



caa tgg gat ccc cac att gtt gag tgg cac tga

1041

Gln Trp Asp Pro His Ile Val Glu Trp His

340

345

<210> 6

<211> 346

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Tyr Asn Gly Ser Cys Cys Arg Ile Glu Gly Asp Thr Ile Ser Gln

1

5

10

15

Val Met Pro Pro Leu Leu Ile Val Ala Phe Val Leu Gly Ala Leu Gly

20

20

25

30

Asn Gly Val Ala Leu Cys Gly Phe Cys Phe His Met Lys Thr Trp Lys

35

40

45

Pro Ser Thr Val Tyr Leu Phe Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu

50

55

60

Met Ile Cys Leu Pro Phe Arg Thr Asp Tyr Tyr Leu Arg Arg Arg His

65

70

75

80

30

Trp Ala Phe Gly Asp Ile Pro Cys Arg Val Gly Leu Phe Thr Leu Ala

85

90

95

Met Asn Arg Ala Gly Ser Ile Val Phe Leu Thr Val Val Ala Ala Asp

100

105

110

Arg Tyr Phe Lys Val Val His Pro His His Ala Val Asn Thr Ile Ser

115

120

125

Thr Arg Val Ala Ala Gly Ile Val Cys Thr Leu Trp Ala Leu Val Ile

40

130

135

140

Leu Gly Thr Val Tyr Leu Leu Leu Glu Asn His Leu Cys Val Gln Glu  
 145 150 155 160  
 Thr Ala Val Ser Cys Glu Ser Phe Ile Met Glu Ser Ala Asn Gly Trp  
 165 170 175  
 His Asp Ile Met Phe Gln Leu Glu Phe Phe Met Pro Leu Gly Ile Ile  
 180 185 190  
 Leu Phe Cys Ser Phe Lys Ile Val Trp Ser Leu Arg Arg Arg Gln Gln  
 195 200 205  
 Leu Ala Arg Gln Ala Arg Met Lys Lys Ala Thr Arg Phe Ile Met Val  
 210 215 220  
 Val Ala Ile Val Phe Ile Thr Cys Tyr Leu Pro Ser Val Ser Ala Arg  
 225 230 235 240  
 Leu Tyr Phe Leu Trp Thr Val Pro Ser Ser Ala Cys Asp Pro Ser Val  
 245 250 255  
 His Gly Ala Leu His Ile Thr Leu Ser Phe Thr Tyr Met Asn Ser Met  
 260 265 270  
 Leu Asp Pro Leu Val Tyr Tyr Phe Ser Ser Pro Ser Phe Pro Lys Phe  
 275 280 285  
 Tyr Asn Lys Leu Lys Ile Cys Ser Leu Lys Pro Lys Gln Pro Gly His  
 290 295 300  
 Ser Lys Thr Gln Arg Pro Glu Glu Met Pro Ile Ser Asn Leu Gly Arg  
 305 310 315 320  
 Arg Ser Cys Ile Ser Val Ala Asn Ser Phe Gln Ser Gln Ser Asp Gly  
 325 330 335  
 Gln Trp Asp Pro His Ile Val Glu Trp His  
 340 345

10

20

30

40

(210) 7  
 (211) 1092  
 (212) DNA  
 (213) Homo sapiens

(220)  
 (221) CDS  
 (222) (1)..(1092)

10

(400) 7

atg aat cgg cac cat ctg cag gat cac ttt ctg gaa ata gac aag aag 48  
 Met Asn Arg His His Leu Gln Asp His Phe Leu Glu Ile Asp Lys Lys  
 1 5 10 15

20

aac tgc tgt gtg ttc cga gat gac ttc att gtc aag gtg ttg ccg ccg 96  
 Asn Cys Cys Val Phe Arg Asp Asp Phe Ile Val Lys Val Leu Pro Pro  
 20 25 30

gtg ttg ggg ctg gag ttt atc ttc ggg ctt ctg ggc aat ggc ctt gcc 144  
 Val Leu Gly Leu Glu Phe Ile Phe Gly Leu Leu Gly Asn Gly Leu Ala  
 35 40 45

30

ctg tgg att ttc tgt ttc cac ctc aag tcc tgg aaa tcc agc cgg att 192  
 Leu Trp Ile Phe Cys Phe His Leu Lys Ser Trp Lys Ser Ser Arg Ile  
 50 55 60

ttc ctg ttc aac ctg gca gtg gct gac ttt cta ctg atc atc tgc ctg 240  
 Phe Leu Phe Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu Ile Ile Cys Leu  
 65 70 75 80

40

ccc ttc ctg atg gac aac tat gtg agg cgt tgg gac tgg aag ttt ggg	288	
Pro Phe Leu Met Asp Asn Tyr Val Arg Arg Trp Asp Trp Lys Phe Gly		
85 90 95		
gac atc cct tgc cgg ctg atg ctc ttc atg ttg gct atg aac cgc cag	336	
Asp Ile Pro Cys Arg Leu Met Leu Phe Met Leu Ala Met Asn Arg Gln		10
100 105 110		
ggc agc atc atc ttc ctc acg gtg gtg gcg gta gac agg tat ttc cgg	384	
Gly Ser Ile Ile Phe Leu Thr Val Val Ala Val Asp Arg Tyr Phe Arg		
115 120 125		
gtg gtc cat ccc cac cac gcc ctg aac aag atc tcc aat cgg aca gca	432	20
Val Val His Pro His His Ala Leu Asn Lys Ile Ser Asn Arg Thr Ala		
130 135 140		
gcc atc atc tct tgc ctt ctg tgg ggc atc act att ggc ctg aca gtc	480	
Ala Ile Ile Ser Cys Leu Leu Trp Gly Ile Thr Ile Gly Leu Thr Val		
145 150 155 160		30
cac ctc ctg aag aag aag atg ccg atc cag aat ggc ggt gca aat ttg	528	
His Leu Leu Lys Lys Lys Met Pro Ile Gln Asn Gly Gly Ala Asn Leu		
165 170 175		
tgc agc agc ttc agc atc tgc cat acc ttc cag tgg cac gaa gcc atg	576	
Cys Ser Ser Phe Ser Ile Cys His Thr Phe Gln Trp His Glu Ala Met		40
180 185 190		

ttc ctc ctg gag ttc ttc ctg ccc ctg ggc atc atc ctg ttc tgc tca 624  
 Phe Leu Leu Glu Phe Phe Leu Pro Leu Gly Ile Ile Leu Phe Cys Ser  
 195 200 205

gcc aga att atc tgg agc ctg cgg cag aga caa atg gac cgg cat gcc 672  
 Ala Arg Ile Ile Trp Ser Leu Arg Gln Arg Gln Met Asp Arg His Ala  
 210 215 220

10

aag atc aag aga gcc atc acc ttc atc atg gtg gtg gcc atc gtc ttt 720  
 Lys Ile Lys Arg Ala Ile Thr Phe Ile Met Val Val Ala Ile Val Phe  
 225 230 235 240

gtc atc tgc ttc ctt ccc agc gtg gtt gtg cgg atc cgc atc ttc tgg 768  
 Val Ile Cys Phe Leu Pro Ser Val Val Val Arg Ile Arg Ile Phe Trp  
 245 250 255

20

ctc ctg cac act tcg ggc acg cag aat tgt gaa gtg tac cgc tcg gtg 816  
 Leu Leu His Thr Ser Gly Thr Gln Asn Cys Glu Val Tyr Arg Ser Val  
 260 265 270

gac ctg gcg ttc ttt atc act ctc agc ttc acc tac atg aac agc atg 864  
 Asp Leu Ala Phe Phe Ile Thr Leu Ser Phe Thr Tyr Met Asn Ser Met  
 275 280 285

30

ctg gac ccc gtg gtg tac tac ttc tcc agc cca tcc ttt ccc aac ttc 912  
 Leu Asp Pro Val Val Tyr Tyr Phe Ser Ser Pro Ser Phe Pro Asn Phe  
 290 295 300

40

ttc tcc act ttg atc aac cgc tgc ctc cag agg aag atg aca ggt gag 960

Phe Ser Thr Leu Ile Asn Arg Cys Leu Gln Arg Lys Met Thr Gly Glu  
 305 310 315 320

cca gat aat aac cgc agc acg agc gtc gag ctc aca ~~ggg~~ gac ccc aac 1008  
 Pro Asp Asn Asn Arg Ser Thr Ser Val Glu Leu Thr Gly Asp Pro Asn  
 325 330 335

10

aaa acc aga ~~ggc~~ gct cca gag gcg tta atg gcc aac tcc ggt gag cca 1056  
 Lys Thr Arg Gly Ala Pro Glu Ala Leu Met Ala Asn Ser Gly Glu Pro  
 340 345 350

~~igg~~ agc ccc tct tat ctg ~~ggc~~ cca acc tct cct taa 1092  
 Trp Ser Pro Ser Tyr Leu Gly Pro Thr Ser Pro  
 355 360

20

<210> 8

<211> 363

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 8

Met Asn Arg His His Leu Gln Asp His Phe Leu Glu Ile Asp Lys Lys  
 1 5 10 15  
 Asn Cys Cys Val Phe Arg Asp Asp Phe Ile Val Lys Val Leu Pro Pro  
 20 25 30  
 Val Leu Gly Leu Glu Phe Ile Phe Gly Leu Leu Gly Asn Gly Leu Ala  
 35 40 45  
 Leu Trp Ile Phe Cys Phe His Leu Lys Ser Trp Lys Ser Ser Arg Ile

40

50	55	60	
Phe Leu Phe Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu Ile Ile Cys Leu			
65	70	75	80
Pro Phe Leu Met Asp Asn Tyr Val Arg Arg Trp Asp Trp Lys Phe Gly			
	85	90	95
Asp Ile Pro Cys Arg Leu Met Leu Phe Met Leu Ala Met Asn Arg Gln			
100	105	110	10
Gly Ser Ile Ile Phe Leu Thr Val Val Ala Val Asp Arg Tyr Phe Arg			
115	120	125	
Val Val His Pro His His Ala Leu Asn Lys Ile Ser Asn Arg Thr Ala			
130	135	140	
Ala Ile Ile Ser Cys Leu Leu Trp Gly Ile Thr Ile Gly Leu Thr Val			
145	150	155	160
His Leu Leu Lys Lys Lys Met Pro Ile Gln Asn Gly Gly Ala Asn Leu			20
	165	170	175
Cys Ser Ser Phe Ser Ile Cys His Thr Phe Gln Trp His Glu Ala Met			
180	185	190	
Phe Leu Leu Glu Phe Phe Leu Pro Leu Gly Ile Ile Leu Phe Cys Ser			
195	200	205	
Ala Arg Ile Ile Trp Ser Leu Arg Gln Arg Gln Met Asp Arg His Ala			
210	215	220	30
Lys Ile Lys Arg Ala Ile Thr Phe Ile Met Val Val Ala Ile Val Phe			
225	230	235	240
Val Ile Cys Phe Leu Pro Ser Val Val Val Arg Ile Arg Ile Phe Trp			
	245	250	255
Leu Leu His Thr Ser Gly Thr Gln Asn Cys Glu Val Tyr Arg Ser Val			
260	265	270	
Asp Leu Ala Phe Phe Ile Thr Leu Ser Phe Thr Tyr Met Asn Ser Met			40
275	280	285	

Leu Asp Pro Val Val Tyr Tyr Phe Ser Ser Pro Ser Phe Pro Asn Phe  
 290 295 300  
 Phe Ser Thr Leu Ile Asn Arg Cys Leu Gln Arg Lys Met Thr Gly Glu  
 305 310 315 320  
 Pro Asp Asn Asn Arg Ser Thr Ser Val Glu Leu Thr Gly Asp Pro Asn  
 325 330 335  
 Lys Thr Arg Gly Ala Pro Glu Ala Leu Met Ala Asn Ser Gly Glu Pro  
 340 345 350  
 Trp Ser Pro Ser Tyr Leu Gly Pro Thr Ser Pro  
 355 360

10

<210> 9

20

<211> 1092

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1092)

30

<400> 9

atg aat cgg cac cat ctg cag gat cac ttt ctg gaa ata gac aag aag 48  
 Met Asn Arg His His Leu Gln Asp His Phe Leu Glu Ile Asp Lys Lys  
 1 5 10 15

aac tgc tgt gtg ttc cga gat gac ttc att gtc aag gtg ttg ccg ccg 96  
 Asn Cys Cys Val Phe Arg Asp Asp Phe Ile Val Lys Val Leu Pro Pro

40



20	25	30		
gtg ttg ggg ctg gag ttt atc ttc ggg ctt ctg ggc aat ggc ctt gcc	144			
Val Leu Gly Leu Glu Phe Ile Phe Gly Leu Leu Gly Asn Gly Leu Ala				
35	40	45		
ctg tgg att ttc tgt ttc cac ctc aag tcc tgg aaa tcc agc cgg att	192		10	
Leu Trp Ile Phe Cys Phe His Leu Lys Ser Trp Lys Ser Ser Arg Ile				
50	55	60		
ttc ctg ttc aac ctg gca gtg gct gac ttt cta ctg atc atc tgc ctg	240			
Phe Leu Phe Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu Ile Ile Cys Leu				
65	70	75	80	
				20
ccc ttc ctg atg gac aac tat gtg agg cgt tgg gac tgg aag ttt ggg	288			
Pro Phe Leu Met Asp Asn Tyr Val Arg Arg Trp Asp Trp Lys Phe Gly				
85	90	95		
gac atc cct tgc cgg ctg atg ctc ttc atg ttg gct atg aac cgc cag	336			
Asp Ile Pro Cys Arg Leu Met Leu Phe Met Leu Ala Met Asn Arg Gln				
100	105	110	30	
ggc agc atc atc ttc ctc acg gtg gtg gcg gta gac agg tat ttc cgg	384			
Gly Ser Ile Ile Phe Leu Thr Val Val Ala Val Asp Arg Tyr Phe Arg				
115	120	125		
gtg gtc cat ccc cac cac gcc ctg aac aag atc tcc aat cgg aca gca	432			
Val Val His Pro His His Ala Leu Asn Lys Ile Ser Asn Arg Thr Ala			40	
130	135	140		

gcc atc atc tct tgc ctt ctg tgg ggc atc act att ggc ctg aca gtc	480	
Ala Ile Ile Ser Cys Leu Leu Trp Gly Ile Thr Ile Gly Leu Thr Val		
145	150	155
		160
cac ctc ctg aag aag aag atg ccg atc cag aat ggc ggt gca aat ttg	528	
His Leu Leu Lys Lys Lys Met Pro Ile Gln Asn Gly Gly Ala Asn Leu		10
	165	170
		175
tgc agc agc ttc agc atc tgc cat acc ttc cag tgg cac gaa gcc atg	576	
Cys Ser Ser Phe Ser Ile Cys His Thr Phe Gln Trp His Glu Ala Met		
	180	185
		190
ttc ctc ctg gag ttc ttc ctg ccc ctg ggc atc atc ctg ttc tgc tca	624	20
Phe Leu Leu Glu Phe Phe Leu Pro Leu Gly Ile Ile Leu Phe Cys Ser		
	195	200
		205
gcc aga att atc tgg agc ctg cgg cag aga caa atg gac cgg cat gcc	672	
Ala Arg Ile Ile Trp Ser Leu Arg Gln Arg Gln Met Asp Arg His Ala		
	210	215
		220
aag atc aag aga gcc atc acc ttc atc atg gtg gtg gcc atc gtc ttt	720	30
Lys Ile Lys Arg Ala Ile Thr Phe Ile Met Val Val Ala Ile Val Phe		
225	230	235
		240
gtc atc tgc ttc ctt ccc agc gtg gtt gtg cgg atc cgc atc ttc tgg	768	
Val Ile Cys Phe Leu Pro Ser Val Val Val Arg Ile Arg Ile Phe Trp		
	245	250
		255
		40

ctc ctg cac act tcg ggc acg cag aat tgt gaa gtg tac cgc tcg gtg 816  
 Leu Leu His Thr Ser Gly Thr Gln Asn Cys Glu Val Tyr Arg Ser Val  
 260 265 270

gac ctg gcg ttc ttt atc act ctc agc ttc acc tac atg aac agc atg 864  
 Asp Leu Ala Phe Phe Ile Thr Leu Ser Phe Thr Tyr Met Asn Ser Met  
 275 280 285

10

ctg gac ccc gtg gtg tac tac ttc tcc agc cca tcc ttt ccc aac ttc 912  
 Leu Asp Pro Val Val Tyr Tyr Phe Ser Ser Pro Ser Phe Pro Asn Phe  
 290 295 300

ttc tcc act ttg atc aac cgc tgc ctc cag agg aag atg aca ggt gag 960  
 Phe Ser Thr Leu Ile Asn Arg Cys Leu Gln Arg Lys Met Thr Gly Glu  
 305 310 315 320

20

cca gat aat aac cgc agc acg agc gtc gag ctc aca ggg gac ccc aac 1008  
 Pro Asp Asn Asn Arg Ser Thr Ser Val Glu Leu Thr Gly Asp Pro Asn  
 325 330 335

aaa acc aga ggc gct cca gag gcg tta atg gcc aac tcc gaa cca gga 1056  
 Lys Thr Arg Gly Ala Pro Glu Ala Leu Met Ala Asn Ser Glu Pro Gly  
 340 345 350

30

tct ctg gag aaa cag ttg ggc tgt tgc atc gag taa 1092  
 Ser Leu Glu Lys Gln Leu Gly Cys Cys Ile Glu  
 355 360

40

<210> 10

<211> 363

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Asn Arg His His Leu Gln Asp His Phe Leu Glu Ile Asp Lys Lys  
 1 5 10 15  
 Asn Cys Cys Val Phe Arg Asp Asp Phe Ile Val Lys Val Leu Pro Pro  
 20 25 30  
 Val Leu Gly Leu Glu Phe Ile Phe Gly Leu Leu Gly Asn Gly Leu Ala  
 35 40 45  
 Leu Trp Ile Phe Cys Phe His Leu Lys Ser Trp Lys Ser Ser Arg Ile  
 50 55 60  
 Phe Leu Phe Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu Ile Ile Cys Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Phe Leu Met Asp Asn Tyr Val Arg Arg Trp Asp Trp Lys Phe Gly  
 85 90 95  
 Asp Ile Pro Cys Arg Leu Met Leu Phe Met Leu Ala Met Asn Arg Gln  
 100 105 110  
 Gly Ser Ile Ile Phe Leu Thr Val Val Ala Val Asp Arg Tyr Phe Arg  
 115 120 125  
 Val Val His Pro His His Ala Leu Asn Lys Ile Ser Asn Arg Thr Ala  
 130 135 140  
 Ala Ile Ile Ser Cys Leu Leu Trp Gly Ile Thr Ile Gly Leu Thr Val  
 145 150 155 160  
 His Leu Leu Lys Lys Lys Met Pro Ile Gln Asn Gly Gly Ala Asn Leu  
 165 170 175  
 Cys Ser Ser Phe Ser Ile Cys His Thr Phe Gln Trp His Glu Ala Met

10

20

30

40

180	185	190	
Phe Leu Leu Glu Phe Phe Leu Pro Leu Gly Ile Ile Leu Phe Cys Ser			
195	200	205	
Ala Arg Ile Ile Trp Ser Leu Arg Gln Arg Gln Met Asp Arg His Ala			
210	215	220	
Lys Ile Lys Arg Ala Ile Thr Phe Ile Met Val Val Ala Ile Val Phe			
225	230	235	10
Val Ile Cys Phe Leu Pro Ser Val Val Val Arg Ile Arg Ile Phe Trp			
245	250	255	
Leu Leu His Thr Ser Gly Thr Gln Asn Cys Glu Val Tyr Arg Ser Val			
260	265	270	
Asp Leu Ala Phe Phe Ile Thr Leu Ser Phe Thr Tyr Met Asn Ser Met			
275	280	285	
Leu Asp Pro Val Val Tyr Tyr Phe Ser Ser Pro Ser Phe Pro Asn Phe			20
290	295	300	
Phe Ser Thr Leu Ile Asn Arg Cys Leu Gln Arg Lys Met Thr Gly Glu			
305	310	315	
Pro Asp Asn Asn Arg Ser Thr Ser Val Glu Leu Thr Gly Asp Pro Asn			
325	330	335	
Lys Thr Arg Gly Ala Pro Glu Ala Leu Met Ala Asn Ser Glu Pro Gly			
340	345	350	30
Ser Leu Glu Lys Gln Leu Gly Cys Cys Ile Glu			
355	360		

(210) 11

(211) 33

(212) DNA

40

**<213> Artificial Sequence****<220>****<223> Description of Artificial Sequence:Primer-F****<400> 11****aaagcggccg catgttgtgt caccgtggig gcc****33**

10

**<210> 12****<211> 41****<212> DNA****<213> Artificial Sequence**

20

**<220>****<223> Description of Artificial Sequence:Primer-R****<400> 12****ggcgctcagc gtacagccca tgccttggga ggagccttcc t****41**

30

**【図面の簡単な説明】****【図 1】**

本発明の 5 - o x o - E T E 受容体のアゴニストのスクリーニング結果を示す図である。

**【図 2】**

本発明の 5 - o x o - E T E 受容体のアゴニストのスクリーニング結果を示す図である。

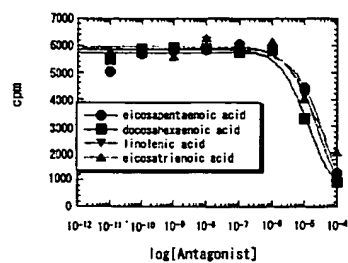
**【図 3】**

本発明の 5 - o x o - E T E 受容体のアンタゴニストのスクリーニング結果を示す図である。

**【図 4】**

本発明の 5 - o x o - E T E 受容体の発現分布についての R T - P C R の結果を示す図である。 40

【圖 3】



【图 4】



